

PAT-NO: JP402065779A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 02065779 A

TITLE: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST COLIFORM
BACILLUS DERIVED BETA-GALACTOSIDASE AND IMMUNOASSAY OF
COLIFORM BACILLUS USING SAME ANTIBODY

PUBN-DATE: March 6, 1990

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

KATAOKA, KATSUYUKI

MARUYAMA, OSAMU

UEDA, CHIEMI

SUGIMOTO, SEIKICHI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

KOHJIN CO LTD

COUNTRY

N/A

APPL-NO: JP63215037

APPL-DATE: August 31, 1988

INT-CL (IPC): C12N005/16, G01N033/569 , G01N033/573 ,
G01N033/577
 , A61K039/395 , C12P021/00

US-CL-CURRENT: 530/388.26

ABSTRACT:

PURPOSE: To readily detect coliform bacillus in foods by
using coliform
bacillus derived β -galactosidase and biochemically
producing a monoclonal
antibody capable of reacting with coliform bacillus derived

*B-Gal
chem 14*

β-galactosidase without reacting with coliform group
except coliform
bacillus.

CONSTITUTION: Mouse splenic cells immunized with
coliform bacillus derived
β-galactosidase and cells obtained from mouse myeloma
cell line are fused
to form hybridomas. From the resultant hybridomas, ones
having producibility
of a monoclonal antibody capable of reacting only with
coliform bacillus
derived β-galactosidase are selected. As the
above-mentioned hybridomas
4H6 strain (FERM P-10183) and 14D8 strain are exemplified.

COPYRIGHT: (C)1990, JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A)

平2-65779

⑮ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)3月6日

C 12 N 5/16
G 01 N 33/569
33/573
33/577
// A 61 K 39/395
C 12 P 21/00

F 7906-2G
A 7906-2G
B 7906-2G
N 8829-4C
D 6712-4B

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全13頁)

⑭ 発明の名称 大腸菌由来β-ガラクトシダーゼに対するモノクローナル抗体及び
それを用いる大腸菌の免疫学的測定法

⑯ 特 願 昭63-215037

⑰ 出 願 昭63(1988)8月31日

⑱ 発 明 者 片 岡 勝 幸 大分県佐伯市字野岡11772-81
⑱ 発 明 者 丸 山 修 大分県佐伯市字野岡11772-81
⑱ 発 明 者 植 田 千 恵 美 大分県佐伯市長島町4-11-26
⑱ 発 明 者 杉 本 征 吉 東京都杉並区久我山1丁目5番2-323号
⑰ 出 願 人 株 式 会 社 興 人 東京都港区新橋1丁目1番1号

明 細 書

1. 発明の名称

大腸菌由来β-ガラクトシダーゼに対するモノクローナル抗体及びそれを用いる大腸菌の免疫学的測定法

2. 特許請求の範囲

1. 大腸菌以外に由来するβ-ガラクトシダーゼとは反応せず、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼとは特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

2. ハイブリドーマ株が4H6株(寄託番号FERM P-10183)であることを特徴とする特許請求の範囲第1項のハイブリドーマ。

3. ハイブリドーマ株が14D8株(寄託番号FERM P-10184)であることを特徴とする特許請求の範囲第1項のハイブリドーマ。

4. 大腸菌以外に由来するβ-ガラクトシダーゼとは反応せず、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼとは特異的に反応するモノクローナル抗体。

5. 大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼで免疫されたマウス細胞と、マウスの骨髓腫細胞ラインから得た細胞とを融合してハイブリドーマを形成し、選別することの特徴とする大腸菌由来β-ガラクトシダーゼに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの製造方法。

6. 大腸菌以外に由来するβ-ガラクトシダーゼとは反応せず大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼとは特異的に反応するモノクローナル抗体と大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼとの免疫学的反応により測定することの特徴とする大腸菌の迅速測定方法。

7. モノクローナル抗体がハイブリドーマ株4H6株(寄託番号FERM P-10183)またはハイブリドーマ株14D8株(寄託番号FERM P-10184)から産生される抗体を用いることを特徴とする特許請求の範囲第6項の大腸菌の迅速測定方法。

3. 発明の詳細な説明
(産業上の利用分野)

本発明は食品その他の中間材料、製品等に含まれる種々の細菌のなかで特に大腸菌のみを選別的、簡便且つ迅速に測定する方法及びそれに用いるモノクローナル抗体に関する。

(従来技術)

食品をはじめとして化粧品、医薬品等多くの分野で製造工程や製品の衛生管理として細菌の測定が行われている。特に、食品分野では衛生管理は重要であり、法令により冷凍食品の成分規格として大腸菌群、サルモネラ菌等が混入しているかどうかの試験が規定されている。一方これまで行われている細菌の測定法は2～4回の培養を行うために繁雑でしかも数日間を要し、さらに菌の同定には経費を要するものであった。

例えば、具体的には食品中の大腸菌群の検査は推定試験、確定試験、完全試験の3段階の培養を必要とする。すなわち乳糖ブイヨン発酵管に接種した後、35～37℃で24時間または48時間培養し、ガス発生がみられたものを推定試験陽性とし、確定試験を行う。確定試験では推定試験陽

性の乳糖ブイヨン発酵管から1白金耳量をBGLB発酵管に移植し、35～37℃で48時間培養し、ガスを発生したものは、さらにBGLB発酵管からとりEMB寒天培地または遠藤寒天培地の平板上に画線培養する。これらの培地で24時間培養した後、典型的な大腸菌群の集落が発生したら確定試験陽性とする。確定試験結果が陽性の場合には更に次の完全試験を行う。

完全試験としては確定試験の集落2個以上より釣菌し、それぞれ乳糖ブイヨン発酵管および普通寒天斜面に移植する。乳糖ブイヨン発酵管で35～37℃、48時間以内にガスを発生したものは、寒天斜面培養上の集落について、グラム染色、芽胞染色を行う。乳糖ブイヨンでガスを発生し、寒天斜面菌でグラム陰性、無芽胞の桿菌を証明すれば完全試験陽性である。大腸菌の測定においては、大腸菌群の確定試験においてBGLB発酵管法を行う時、並行して、別に用意したEC培地においても44.5℃±0.2℃で24～48時間培養する。ガス発生が認められたものを陽性とし、1

MVIC系による菌型決定を行う。

この様に大腸菌群の測定は菌型を決定するまでに3～4段階の培養が必要であり、多くの日数と手間を要する非常に面倒なものである。

(発明が解決しようとする課題)

以上のように従来行われてきた推定試験、確定試験、完全試験の3段階の培養を行って大腸菌や大腸菌以外の大腸菌群(以下、大腸菌以外の大腸菌群を単に大腸菌群という。)の菌型を決定する方法は、数日間の培養が必要であること、無菌操作を必要とする植菌回数が多く操作が繁雑でしかも技術を要する等、食品中の衛生管理方法としては不便な点が多かった。

大腸菌や大腸菌群は、乳糖を添加した培地中で培養するとβ-ガラクトシダーゼの産生が誘導されることは知られているが、産生されるβ-ガラクトシダーゼは大腸菌と大腸菌群では、両者が近縁である為非常に性質が類似しており、免疫学的に両者のβ-ガラクトシダーゼを区別することは難しかった。

(課題を解決する為の手段)

もし、大腸菌群由来のβ-ガラクトシダーゼに対しては全く反応しないが大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼとは特異的に反応する抗体が得られれば、それを利用してエンザイムイムノアッセイやその他の免疫学的方法によって、大腸菌の測定を容易に行うことができる。本発明者等は以上の考えに基づき、鋭意検討した結果、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼに対しては高い反応性を有するが、大腸菌群由来のβ-ガラクトシダーゼとは反応性を有さないモノクローナル抗体を調製することができ、このモノクローナル抗体を用いて免疫学的反応により測定を行うことにより大腸菌を容易に選別的にしかも精確かつ短時間で測定することができることを見出し本発明に到達したものである。

即ち、本発明は大腸菌以外に由来するβ-ガラクトシダーゼとは反応せず、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼとは特異的に反応するモノクローナル抗体、この抗体を産生するハイブリドーマ及

びその製造方法、及びかかるモノクローナル抗体と大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼとの免疫学的反応により測定することの特徴とする大腸菌の迅速測定方法に関する。

以下に本発明の抗体の製造方法及び迅速測定方法の例を説明するが本発明はこれらの記載に限定されるものではない。

尚、本発明において用いた菌株としては、大腸菌は *Escherichia coli* IFO No. 3301, No. 3806, No. 3972) の3種、大腸菌群はその代表として *Klebsiella pneumoniae* IFO No. 13541, *Erwinia carotovora* IFO No. 13921, *Enterobacter cloacae* IFO No. 13535, *Citrobacter freundii* IFO No. 12681 の4種である。

(1) ハイブリドーマ株の取得法。

精製された大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ

40培地)中に 5×10^5 個/ml程度となる様に懸濁し、ペトリディッシュまたはカルチャーボトル中で培養する。数日間培養を行い、対数増殖期にあって細胞の状態が良いものを選んで細胞融合に用いる。

前記の取り出した脾臓細胞 $1 \sim 4 \times 10^8$ 個を含む液とミエローマ細胞 2×10^7 個を含む液をそれぞれ遠心分離して上清を除いた後、これらの脾臓細胞とミエローマ細胞残液を十分に混合する。次に、この混合液に50%ポリエチレングリコール(1000~4000が良い)及び13%ジメチルスルホキシドを含むRPMI-1640培地を1ml添加してゆるやかに1分間攪拌した後、30秒間隔で1mlのRPMI-1640培地を加え、約5分間で10mlを添加する。細胞を遠心分離して集め、HT(+FCS)培地約120mlに懸濁し、細胞培養用96穴プレートの各穴に0.1~0.15mlずつ分注して炭酸ガス培養器中で培養する。

翌日、各穴にHAT(+FCS)培地(ヒボキ

25~100 μ gを生理食塩水0.1mlに溶かし、完全フロイントアジュバントと1:1に混合乳化させる。調製したエマルジョンを5~10週令のBALB/cマウスの腹腔内に注射する。その後3~5週間飼育した後、大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼ25~100 μ gを生理食塩水0.1mlに溶かし静脈内に注射する。更に3~5週間間隔で同じ様に1~2回の追加免疫を行った後、更に1週間後に最終免疫を行う事によって抗体価を充分にあげる。最終免疫3日後にクリーンベンチ中で無菌的に脾臓をとり出し、RPMI-1640培地中でほぐして脾臓細胞を懸濁し、細胞融合に用いる。

一方、マウスBALB/cミエローマ細胞P3-X63-Ag8-U1株(以下P3U1という)、X63-Ag8-6.5.3株(以下X-653という)、またはP3-NSI-1-Ag4-1株を凍結保存より取り出して洗浄後、この細胞株をHT(+FCS)培地(ヒボキサンチン、チミジン、10%牛胎児血清を含むRPMI-16

サンチン、アミノプテリン、チミジン、10%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地)を各穴に約0.1mlずつ添加する。3日後及び6日後にそれぞれ培地の半分量を吸引除去した後新しいHAT(+FCS)培地を約0.1mlずつ加える。10~14日後に、ハイブリドーマのコロニーが肉眼で見える大きさになりしだい、ベルオキシダーゼを用いるELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)法によって、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼに対する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングする。

前記ELISA法に用い得る諸材料として、例えば、標識抗体としては市販されている西洋ワサビベルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体を、発色剤としてはABTS(2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))を、抗原としての大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼはシグマ社製 β -ガラクトシダーゼG5

635をそのまま用いることができるが、これらに限定されるものではない。また、大腸菌群に属するクレブシエラ・ニューモニア(*Klebsiella pneumoniae*)由来の β -ガラクトシダーゼは、Gary R. Cravenらの方法(*The Journal of Biological Chemistry* Vol. 240, No. 6, 2468-2477 (1965))に準じて培養液より分離精製したものをを用いることができる。培養液を β -ガラクトシダーゼを含む試料液として用いる場合には、各菌をグリシン及びラクトースを含む培地で培養した後、培養液を遠心分離して、その上澄を用いる。

このようにしてELISA法によってクレブシエラ・ニューモニア由来の β -ガラクトシダーゼに対しては反応性が弱く、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼに対しては反応性が強い抗体を産生するハイブリドーマだけを選び出し、限界希釈法を2回以上行ってクローニングし、ハイブリドーマ細胞株を得る。

キットを使用)に吸着させた後、溶出バッファーで抗体を溶出させることによって精製抗体を得ることができる。

(3) 抗体固相化プレートの調製方法

0.01~0.2mg/mlの濃度のモノクローナル抗体溶液をマイクロプレートに分注して抗体をコーティングし、牛血清アルブミン(以下BSAという)でブロッキングしたものを使用する。(4) サンドイッチEIAを行うために用いるベルオキシダーゼ標識抗 β -ガラクトシダーゼ抗体の調製方法。

大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ0.2~1.0mgを生理食塩水0.25mlに溶かし、完全フロイントアジュバントと1:1に混合乳化した後、ウサギの背皮下に注射する。3~5週間後、 β -ガラクトシダーゼ0.2~1.0mgを生理食塩水0.25mlに溶かした後、同じウサギに静脈注射する。7~9日後に採血し、血清を得ることができる。この血清をマウスモノクローナル抗体と同様にプロテインAカラムによって処理す

以上のようにしてクローニングして得られた細胞株について、他の大腸菌群由来の β -ガラクトシダーゼに対する反応性を、ベルオキシダーゼ標識した抗 β -ガラクトシダーゼウサギ抗体(自社調製、調製法は後述)を用いたサンドイッチEIA法によって調べ、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼに対しては反応性が強いが、大腸菌群由来の β -ガラクトシダーゼに対しては反応性が弱いものを選び出して目的の細胞株を得ることができる。

(2) 各細胞株の産生する抗体の単離精製方法。

前記のようにして得られたハイブリドーマをディッシュ中で培養した後、あらかじめプリスタン(0.5ml/匹)を腹腔内に注射したマウスに、ハイブリドーマを1匹当り $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ 個を腹腔内に注射する。このマウスを引き続き飼育し、腹水が充分に溜ったときに腹水を採取する。

得られた腹水を遠心分離して上清を採り沈澱は捨てる。上清をプロテインAカラム(バイオラッド社製 アフィゲルプロテインA MAPS-II

ることによって、精製した抗体が得られる。

得られた抗体は、S-Acetylmercaptosuccinic anhydride(半井化学薬品(株)製、以下AMSAという)を用いてSH基を導入し、N-(ϵ -maleimido)caproyloxy)succinimide(同仁化学研究所製、以下EMCSという)を用いてマレイミド基を導入したベルオキシダーゼ(以下PODという)とコンジュゲートを行う。未反応のマレイミド基をメルカプトエチルアミンでブロッキングした後、セファクリルS300カラムでゲル濾過を行い、精製したベルオキシダーゼ標識抗 β -ガラクトシダーゼ抗体を得る。

(5) 評価用試料液の調製方法

大腸菌の測定に用いる抗体は、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼに対する特異性が高いことが必要である。そこで抗体の特異性に対する選別性を試験するために前記の大腸菌3種及び前記の大腸菌群4種の培養を行い、その培養上清を試料液としてサンドイッチEIAその他の測定に使用す

る。なおこの際、培地は、 β -ガラクトシダーゼの産生を誘導し、かつ培地中に β -ガラクトシダーゼを遊離させる為にラクトース及びグリシンを含んだ培地を用いる。

試料液中の β -ガラクトシダーゼの酵素活性は2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド(以下ONPGという)を基質とし、波長405nmの吸光度を測定する方法によって行う。

(6) 抗体の特異性の評価

これらの材料を用いてサンドイッチEIAを行い、本発明者等が取得した大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼに対して特異的に反応するモノクローナル抗体の反応特性を試験した。すなわち、大腸菌3種及び大腸菌群4種のそれぞれの培養上清の β -ガラクトシダーゼ酵素活性を測定し、希釈系列をつくり、サンドイッチアッセイを行う。その結果大腸菌3種とは強く反応するが、大腸菌群4種とは全く反応しないモノクローナル抗体を得る。更に、この特異性が極めて優れた抗体を免疫学的測定法に応用することにより、短時間で簡便にし

かも正確に試料中の大腸菌を測定できることがわかった。

前記の免疫学的測定システムとしてはサンドイッチEIAの他にもいろいろな方法が採用できるが、例として次の3種類の方法を挙げる事ができる。

1) ONPGによる発色を利用する方法

大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼに特異的に反応するモノクローナル抗体をマイクロプレートに固相化し、それに試料液を加えるとモノクローナル抗体の選択性によって大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼのみがプレートに結合し、大腸菌群由来の β -ガラクトシダーゼは全く結合しない。洗浄して未反応物を除いた後、ONPGを含む発色液を加えインキュベーションすると、結合した β -ガラクトシダーゼの量に比例した発色が得られる。肉眼で発色を観察することによって大腸菌の測定ができるので、非常に簡便でまた正確である。

2) 蛍光基質を用いる方法

基質として4-メチルウンベリフェリル- β -

D-ガラクトピラノシド(以下MUGALという)を用いて蛍光発色を観察する以外はONPGによる発色を利用する方法と同じである。本法は操作が簡便であるばかりでなく感度が非常に高く、大腸菌の測定法として優れている。

3) ラテックス凝集反応を利用する方法

大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼに対して特異的に反応するモノクローナル抗体をポリスチレン製ラテックス粒子に結合させて調製したラテックス試薬を用いる方法である。試料とラテックス試薬を混合するだけで、大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼが存在するとラテックス凝集が生じ、肉眼で判定できる。本法は極めて簡便な方法であり、大腸菌濃度が高い場合には有用である。

(実施例)

以下に実施例を示して、本発明を更に具体的に説明するが本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

精製した大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ(

シグマ社製G5635)100 μ gを生理食塩水0.1mlに溶かし、完全フロイントアジュバントと1:1に混合乳化した後、6週令のBALB/cマウスに腹腔内投与した。更に4週間後 β -ガラクトシダーゼ100 μ gを生理食塩水0.1mlに溶かし静脈内に注射した。さらに4週間後及び5週間後に同様に静脈内に注射した。最終免疫の3日後に、脾臓をとり出し、RPMI-1640培地中に細胞をほぐして細胞懸濁液とし、細胞融合に供した。

一方、マウスBALB/cミエローマ細胞P3U1(フローラボラトリーズ社製)を凍結保存より取り出し、洗浄後、10ml量のHT(+FCS)培地中に細胞数が 5×10^5 個/mlとなるように懸濁し、ペトリディッシュ中で培養した。毎日、ディッシュ1枚当たり6ml量の培地を加え、5日間培養を行い、対数増殖期にある細胞を得た。RPMI-1640培地に懸濁し、細胞融合に供した。

脾臓細胞約 2×10^8 個とミエローマ細胞約4

$\times 10^7$ 個遠心分離して集め、RPMI-1640培地でそれぞれ3回洗浄した。再度、遠心分離して上清を除き、脾臓細胞とミエローマ細胞を十分に混合した。次に、50%ポリエチレングリコール1000及び13%スルホキシドを含むRPMI-1640培地を1ml添加してゆるやかに1分間攪拌した後、30秒間隔で1mlのRPMI-1640培地を加え、5分間で10mlを添加した。細胞を遠心分離して集め、HT(+FCS)培地120mlに懸濁し、96穴プレート(ベクトンディッキンソン社製)の各穴に0.1mlずつ分注して培養した。翌日、各穴にHAT(+FCS)培地を0.1mlずつ添加した。3日後及び6日後にそれぞれ、各穴の約半分量の培地を捨て、新しいHAT(+FCS)培地0.1mlずつを加えた。10日後に、ハイブリドーマのコロニーの大きいウェルを選び、ベルオキシダーゼを用いたELISA法によって、抗 β -ガラクトシダーゼ抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。クレバシェラ ニュウモニア由

来の β -ガラクトシダーゼに対して反応性が弱く、大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼに対して反応性が高いハイブリドーマクローンを選り、限界希釈法を2回行ってクローニングし、ハイブリドーマ細胞株4H6(微工研寄託番号FERM P-10183)及び14D8(微工研寄託番号FERM P-10184)を得た。

それぞれのハイブリドーマをディッシュ中で培養して増やし、あらかじめプリスタンを腹腔内注射(0.5ml/匹)したBALB/cマウスに1匹当りハイブリドーマ 1×10^7 個を含む液を腹腔内注射した。引続きマウスを2週間飼育し、たまった腹水を採取した。

ハイブリドーマ細胞株4H6を注射したマウスからは1匹当り5.5mlの腹水が得られ、ハイブリドーマ細胞株14D8を注射したマウスからは1匹当り6.0mlの腹水が得られた。

得られた腹水は遠心分離して上清を採り、アフィゲルプロテインA MAPS-IIキット(バイオラッド社製)を用いて以下の操作によって抗体

を精製した。ゲルを結合バッファーで洗浄した後、ゲル8mlをカラムに充填し、結合バッファーでカラムを平衡化させた。腹水2mlを結合バッファーで2倍に希釈した後、カラムにアブライシ、80mlの結合バッファーで洗浄した。約120mlの溶出バッファー(pH3.0)でIgGを溶出させた。この時溶出液のpHを中性付近にするために、容器に1M Tris-HClバッファー(pH9.0)を入れておいた。カラムは5倍量の再生バッファーで洗い、再使用する。この方法によって腹水2mlを処理し、細胞株4H6では精製抗体4H6, 30.7mgが、細胞株14D8では精製抗体14H8, 33.7mgが得られた。

ハイブリドーマ4H6及び14D8の特性を表-1に示した。

[以下、余白]

表-1 ハイブリドーマの特性表

	4 H 6	1 4 D 8
由 来	マウス抗 β -ガラクトシダーゼ抗体産生細胞とミエローマ細胞P3U1の融合したハイブリドーマである。	同 左
機 能	一定のモノクローナル抗体を定常的に生産する。	同 左
増 殖 性	ミエローマ細胞とほぼ同等の増殖性を示す。すなわち、18~24時間で約2倍に増殖する。 ブリストンを投与したマウスの腹腔内でもほぼ同様の増殖性を示す。	同 左
保 存 性	10% DMSO添加培地に懸濁し、液体窒素中に保存すれば、長期間保存でき、保存後、解凍して培養した時に、保存前と同様の増殖性及び抗体産生能を示す。	同 左
最適増殖条件	温度37℃、pH7.0	同 左
産生する抗体のクラス	I g G	同 左

実施例2

抗 β -ガラクトシダーゼ抗体の調製

大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼ0.25mg(シグマ社G5635)を生理食塩水0.25ml中に溶かし、完全フロイントアジュバントと1:1に混合乳化した後、ウサギの背皮下に注射した。3週間後、 β -ガラクトシダーゼ0.25mgを生理食塩水0.25mlに溶かした後、同じウサギの耳静脈に注射した。8日後、屠殺し全血を採取し、血清30mlを得た。

得られた血清より、実施例1に示したアフィゲルプロテインA MAPS-IIキットを用いた方法により、抗 β -ガラクトシダーゼ抗体14.9mgを精製した。

POD標識抗 β -ガラクトシダーゼ抗体の調製

まず、PODにマレイミド基の導入を行った。POD(ベーリンガーマンハイム社製、POD(EIA用))10mgを0.475mlの0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)に溶解したものに、EMCS(同仁化学研究所製)

1.5mgをDMF25 μ lに溶解したものを、30℃で5分間ブレインキューベーションした後加えた。振とうしながら30℃で30分間インキューベーションを行った。マレイミド基を導入したPODと未反応のEMCSを分ける為、あらかじめ0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH6.0)で平衡化したセファデックスG25カラム(直径1cm、高さ45cm)に反応液をかけ、マレイミド基を導入したPOD画分を得た。セントリコン(アミコン社製)で約250 μ lまで濃縮し抗体との反応に用いた。

次に抗体へSH基の導入を行った。精製した抗 β -ガラクトシダーゼウサギ抗体2.5mgを含む0.1Mリン酸ナトリウムバッファー溶液にジメチルホルムアミド10 μ lに溶かしたAMSA(半井化学薬品(株)製)0.2mgを加え、振とうしながら30℃で30分間インキューベーションした。0.1M Tris-HClバッファー(pH7.0)65 μ l、0.2M EDTA(pH7.0)5 μ l及び0.6M ヒドロキシ

ルアミン塩酸塩(pH7.0)80 μ lを加えて混合した後、30℃で5分間インキュベーションした。未反応物を分ける為に、あらかじめ5mM

EDTAを含んだ0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH6.0)で平衡化したセファデックスG25カラム(直径1cm,高さ45cm)に反応液をかけ、SH基を導入した抗体画分を得た。セントリコンで約250 μ lまで濃縮し、マレイミド基を導入したPODとの反応に用いた。

次にPODコンジュゲート抗体を調製した。SH基を導入した抗体14.7nmolとマレイミド基を導入したPOD23.0nmolを混合し、30℃で1時間インキュベーションを行い、PODと抗体とを反応させた。未反応マレイミド基をブロッキングするため、100mMメルカプトエチルアミン100 μ lを加え、37℃で10分間インキュベーションを行った。反応液はあらかじめ0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH6.5)で平衡化したセファクリルS300カラム(直径1.5cm,高さ45cm)にかけ、P

OD-抗体コンジュゲート画分を得た。得られたPOD-抗体コンジュゲートはIgG濃度として0.31nmol/mlであり、1分子のIgG当り3.5個のPODが結合していた。保存剤としてチメロサルを加えて冷蔵庫に保存し、サンドイッチEIAに使用した。

抗体固相化プレートの作成

実施例1で得られた2種のモノクローナル抗体を0.1mg/mlと成るように0.1M食塩を含む10mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)に溶かし、コーティング液を調製した。マイクロプレート(Nunc社製モジュールプレートF-16 High Binding Capacity)に、そのウェル当り100 μ lのコーティング液を分注し、4℃で一晩静置した。コーティング液を除去した後、0.1%BSA、0.1M食塩を含む10mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)を各ウェル当り200 μ l分注して、4℃に一晩静置してブロッキングを行った。0.05M Tween20を含むリン

酸バッファー(pH7.0)(以下、洗浄液という)で洗浄した後、抗体固相化プレートとしてアッセイに使用した。

試料液の調製

(財)発酵研究所より入手した*Escherichia coli* 3株(IFO No. 3301, No. 3806, No. 3972)及び大腸菌群4株(*Klebsiella pneumoniae* IFO No. 13541, *Erwinia carotovora* IFO No. 13921, *Enterobacter cloacae* IFO No. 13535, *Citrobacter freundii* IFO No. 12681)をスラント培養した後、菌体1白金耳をグリシン添加培地(グリシン 1.2%、ラクトース 1.5%、ポリペプトン 0.5%、イーストエキス 0.5%、 K_2HPO_4 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.002%含有)に接種し、攪拌しながら30℃で20時間培養を行った。培養液

を遠心分離(10,000rpm、30分間)して上清を採り、試料液とした。又、抗原として用いた大腸菌由来の精製 β -ガラクトシダーゼも試料液として用いた。

β -ガラクトシダーゼの酵素活性の測定

試料液はまず、次に示す方法によって酵素活性を測定した。ONPG(和光純薬工業製、試薬特級)79mgを100mM 2-メルカプトエタノール、1mM塩化マグネシウムを含む50mMリン酸カリウムバッファー(pH7.8)100mlに溶解して調製したONPG溶液3mlを試験管に採り、37℃で約5分間ブレインキュベーションした後、試料液20 μ lを添加した。37℃でインキュベーションし、x分後及びy分後に波長405nmの吸光度を測定し、 A_x 及び A_y を得た。次式により β -ガラクトシダーゼの酵素活性を計算した。

$$\text{酵素活性 (units/ml)} = (A_y - A_x) \times 3.02 / \{(y - x) \times 3.5 \times 0.02\}$$

サンドイッチEIA

抗体固相化プレートの各ウェルに試料液100 μ lを入れ、37℃で2時間インキュベーションする。ウェルを前記の洗浄液で3回洗浄した後、0.1M食塩、0.1%BSAを含む10mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.0)で300倍に希釈したPOD-抗体コンジュゲートを各ウェル当たり100 μ l加えた。37℃で2時間インキュベーションした後、前記の洗浄液で5回洗浄し、水をきる。50mMのクエン酸、100mMのリン酸一水素ナトリウム、0.16%のオルトフェニレンジアミン、0.025%過酸化水素及び0.05%BSAより成る発色液をウェル当たり100 μ l加え、37℃で20分間インキュベーションした。反応停止液(4N-硫酸)をウェル当たり50 μ l加え、波長492nmの吸光度を測定した。

測定した吸光度と試料液の β -ガラクトシダーゼ酵素活性の関係を表-2、第1図及び第2図に示した。これらの結果より、本発明のハイブリドーマ株4H6及び14D8から産生された2種の

モノクローナル抗体は共に、大腸菌3株由来の β -ガラクトシダーゼとは強く結合するが、大腸菌群4株由来の β -ガラクトシダーゼとは全く結合しないことがわかった。すなわち、本システムは大腸菌群の有無にかかわらず、大腸菌のみを特異的に測定する方法として有用であることがわかる。

[以下、余白]

表-2 サンドイッチEIAによる β -ガラクトシダーゼの測定結果

固相化抗体	試料	試料液中の酵素活性 (units/ml)				
		1.0	0.2	0.04	0.008	0.0016
4H6	精製 β -ガラクトシダーゼ	1.591	1.516	1.098	0.455	0.087
	E.coli IFO No.3301	1.549	1.488	1.046	0.419	0.080
	E.coli IFO No.3806	1.597	1.554	1.103	0.460	0.092
	E.coli IFO No.3972	1.642	1.580	1.135	0.498	0.101
	K.pneumoniae IFO 13541	0.009	0.008	0.006	0.003	0.006
	E.carotovora IFO 13921	0.010	0.006	0.004	0.005	0.004
	E.cloacae IFO 13535	0.007	0.008	0.005	0.008	0.002
	C.freundii IFO 12681	0.005	0.006	0.004	0.003	0.001
	精製 β -ガラクトシダーゼ	1.587	1.504	1.028	0.440	0.075
	E.coli IFO No.3301	1.540	1.479	0.997	0.414	0.076
14D8	E.coli IFO No.3806	1.613	1.542	1.083	0.462	0.088
	E.coli IFO No.3972	1.639	1.590	1.110	0.486	0.093
	K.pneumoniae IFO 13541	0.007	0.005	0.006	0.003	0.005
	E.carotovora IFO 13921	0.006	0.003	0.005	0.002	0.003
	E.cloacae IFO 13535	0.008	0.006	0.002	0.004	0.000
	C.freundii IFO 12681	0.005	0.005	0.004	0.002	0.001

- 注) 1. 表中の測定値はブランク値を差し引いた吸光度(492nm)を示した。
2. 試料液中の酵素活性は、原液(培養液の遠心分離上清)について測定し、その希釈倍率より計算した値で示した。

実施例 3

実施例 2 で示したサンドイッチ E I A より簡便な測定方法として、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼと特異的に反応するモノクローナル抗体を固相化し、それに試料中の β -ガラクトシダーゼを反応させた後、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定する方法を行った。

まず、実施例 2 と同様に大腸菌由来 β -ガラクトシダーゼと特異的に反応するモノクローナル抗体 2 種についてそれぞれ別にマイクロプレートに固相化した。酵素活性が 1.0 ~ 0.0016 units/ml となるように 0.1 M 食塩、0.1 % BSA を含む 10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) で希釈して得た希釈系列の試料液を各ウェル当り 100 μ l 加え、37℃で 2 時間インキュベーションした。ウェルを前記の洗浄液で 3 回洗浄した後、水を切り、発色剤として ONPG 溶液 (0.03 % を PBS に溶解したもの) を各ウェル当り 100 μ l 加えた。37℃で 30 分間インキュベーションした後、0.2 N -

水酸化ナトリウム溶液をウェル当り 100 μ l 加えて反応を止めた。大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼの濃度に比例して、黄色の発色が認められた。結果を表-3 に示した。本システムは大腸菌の存在を肉眼で判定でき、操作も簡便であった。

[以下、余白]

表-3 ONPG を用いた方法による β -ガラクトシダーゼの測定結果

固相化 抗 体	試 料	試料液中の酵素活性 (units/ml)				
		1.0	0.1	0.01	0.001	0.0001
4 H 6	精製 β -ガラクトシダーゼ	++	++	+	±	-
	E.coli IFO No.3301	++	++	+	±	-
	E.coli IFO No.3806	++	++	+	±	-
	E.coli IFO No.3972	++	++	+	±	-
	K.pneumoniae IFO 13541	-	-	-	-	-
	E.carotovora IFO 13921	-	-	-	-	-
	E.cloacae IFO 13535	-	-	-	-	-
	C.freundii IFO 12681	-	-	-	-	-
14 D 8	精製 β -ガラクトシダーゼ	++	++	+	±	-
	E.coli IFO No.3301	++	++	+	±	-
	E.coli IFO No.3806	++	++	+	±	-
	E.coli IFO No.3972	++	++	+	±	-
	K.pneumoniae IFO 13541	-	-	-	-	-
	E.carotovora IFO 13921	-	-	-	-	-
	E.cloacae IFO 13535	-	-	-	-	-
	C.freundii IFO 12681	-	-	-	-	-

注) ++ ~ - は肉眼で判定した発色強度を示す。

実施例 4

発色剤としてMUGAL(0.02%をPBSに溶解したもの)を加え、判定はマナスライトから発生される紫外線(波長365nm)照射下で蛍光を観察した以外は実施例3と同様にして測定を行い、表-4の結果を得た。本法は操作法も簡単で、大腸菌の存在を肉眼で判定でき、しかも感度はONPGを用いた方法よりも10倍以上高く、大腸菌の測定方法として非常に優れていると言える。

[以下、余白]

表-4 MUGALをもちいた方法によるβ-ガラクトシダーゼの測定結果

固相化 抗 体	試 料	試料液中の酵素活性 (units/ml)				
		1.0	0.1	0.01	0.001	0.0001
4H6	精製β-ガラクトシダーゼ	+++	+++	++	+	±
	E.coli IFO No.3301	+++	+++	++	+	±
	E.coli IFO No.3806	+++	+++	++	+	±
	E.coli IFO No.3972	+++	+++	++	+	±
	K.pneumoniae IFO 13541	±	-	-	-	-
	E.carotovora IFO 13921	±	-	-	-	-
	E.cloacae IFO 13535	-	-	-	-	-
	C.freundii IFO 12681	-	-	-	-	-
14D8	精製β-ガラクトシダーゼ	++	++	+	+	±
	E.coli IFO No.3301	++	++	+	+	±
	E.coli IFO No.3806	++	++	+	+	±
	E.coli IFO No.3972	++	++	+	+	±
	K.pneumoniae IFO 13541	±	-	-	-	-
	E.carotovora IFO 13921	-	-	-	-	-
	E.cloacae IFO 13535	-	-	-	-	-
	C.freundii IFO 12681	-	-	-	-	-

注) +++~-は紫外線照射下において肉眼で判定した蛍光発色強度を示す。

実施例 5

粒径0.22 μ mのポリスチレン製ラテックス粒子(N-200、積水化学工業株式会社製)を1%濃度になるようにグリシンバッファー(pH7.1)に懸濁したもの1客に、実施例1で得られた2種の抗 β -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体を500 μ g/ml濃度の溶液を等量の1客加え、約5分間ゆっくり混合した後、室温で2時間静置した。沈澱をデカンテーションによって除いた後、懸濁液を遠心分離し、ラテックス粒子を集めた。

集めたラテックス粒子に0.1%BSAを含むグリシンバッファー(pH7.1)3客を加え、混合した後、室温で1晩静置した。この混合液を遠心分離してラテックス粒子を集め、グリシンバッファーで2回洗浄した。得られたラテックス粒子を0.1%BSA及び0.1%アジ化ナトリウムを含むグリシンバッファー(pH7.1)に0.5%固形分となるように懸濁し、ラテックス試薬を調製した。

こうして得られたラテックス試薬50 μ lと試料液50 μ lをラテックス凝集判定プレート(積水化学工業株式会社製)上で混合し、室温で10分間静置した後、凝集の有無及びその程度を肉眼で判定した。以上のテストをモノクローナル抗体4H6、14D8の2種類について行ない、各 β -ガラクトシダーゼについて測定した結果を表-5に示した。

これらの結果より、本法によって、極めて簡便かつ迅速に大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼを測定できることがわかった。

[以下、余白]

表-5 ラテックス凝集反応法による β -ガラクトシダーゼの測定結果

固相化抗体	試料	試料液中の酵素活性 (units/ml)			
		2.0	1.0	0.2	0.04
4H6	精製 β -ガラクトシダーゼ	+	+	±	-
	E.coli IFO No.3301	+	+	±	-
	E.coli IFO No.3806	+	+	±	-
	E.coli IFO No.3972	+	+	±	-
	K.pneumoniae IFO 13541	-	-	-	-
	E.carotovora IFO 13921	-	-	-	-
	E.cloacae IFO 13535	-	-	-	-
	C.freundii IFO 12681	-	-	-	-
14D8	精製 β -ガラクトシダーゼ	+	+	±	-
	E.coli IFO No.3301	+	+	±	-
	E.coli IFO No.3806	+	+	±	-
	E.coli IFO No.3972	+	+	±	-
	K.pneumoniae IFO 13541	-	-	-	-
	E.carotovora IFO 13921	-	-	-	-
	E.cloacae IFO 13535	-	-	-	-
	C.freundii IFO 12681	-	-	-	-

注) + ~ - は肉眼で判定した凝集の程度を示す。

(発明の作用及び効果)

食品中の大腸菌の同定には、これまで推定試験、確定試験、完全試験の3段階の培養を要し、操作が繁雑でしかも長い日数がかかった。今回発明した大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼに対して特異的に反応するモノクローナル抗体を用いて、サンドイッチEIAやその他の免疫学的測定システムを作成すれば、試料中の大腸菌を、共存する大腸菌群の影響を受ける事なく測定することができる。

本抗体を用いた測定法は、次のような利点がある。

- 1) 発明した抗体は色々な測定システムに利用できる。
- 2) システムの工夫によって非常に高感度で大腸菌の測定が出来る。
- 3) 測定に要する日数が大幅に短縮できる。
- 4) 操作が簡便で特殊な技術を必要としない。
- 5) 特別な装置を必要としない。

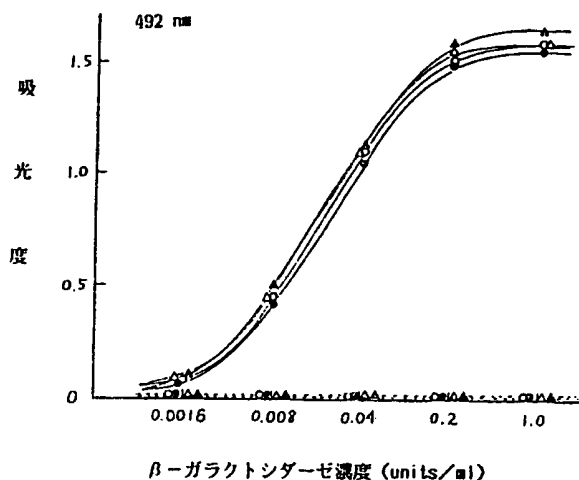
4 図面の簡単な説明

第1図はモノクローナル抗体4H6を用いてサンドイッチアッセイを行った場合の β -ガラクトシダーゼ濃度と吸光度の関係を示した。

第2図はモノクローナル抗体14D8を用いた場合を示した。

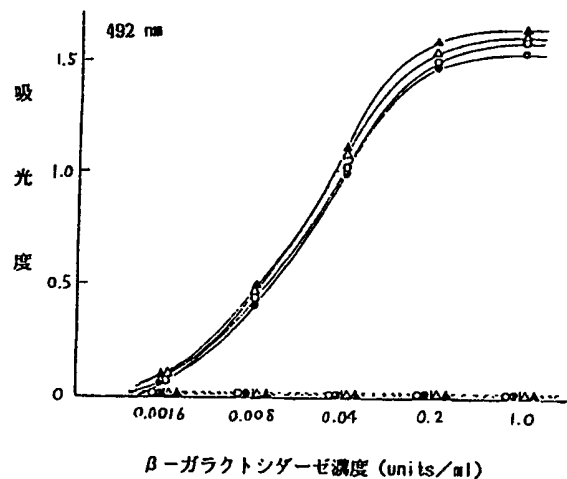
特許出願人 株式会社 興人

第1図



- 精製 β -ガラクトシダーゼ
- *E. coli* IFO No.3301
- △— *E. coli* IFO No.3806
- ▲— *E. coli* IFO No.3972
- *K. pneumoniae* IFO No.13541
- *E. corotovar* IFO No.13921
- △— *E. cloacae* IFO No.13535
- ▲— *C. freundii* IFO No.12681

第2図



- 精製 β -ガラクトシダーゼ
- *E. coli* IFO No.3301
- △— *E. coli* IFO No.3806
- ▲— *E. coli* IFO No.3972
- *K. pneumoniae* IFO No.13541
- *E. corotovar* IFO No.13921
- △— *E. cloacae* IFO No.13535
- ▲— *C. freundii* IFO No.12681